

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

cited in the European Search  
Report of EP 9928650.7  
Your Ref.: DIVER 1150EP

PUBLICATION NUMBER : 09173077  
PUBLICATION DATE : 08-07-97

APPLICATION DATE : 19-07-96  
APPLICATION NUMBER : 08191138

APPLICANT : NAGASE SEIKAGAKU KOGYO KK;

INVENTOR : UZURA KENSAKU;

INT.CL. : C12N 15/09 C07H 21/04 C12N 1/21  
C12N 9/30 C12P 19/14 //(C12N 15/09  
, C12R 1:01 ), (C12N 1/21 ,  
C12R 1:19 ), (C12N 9/30 , C12R  
1:19 )

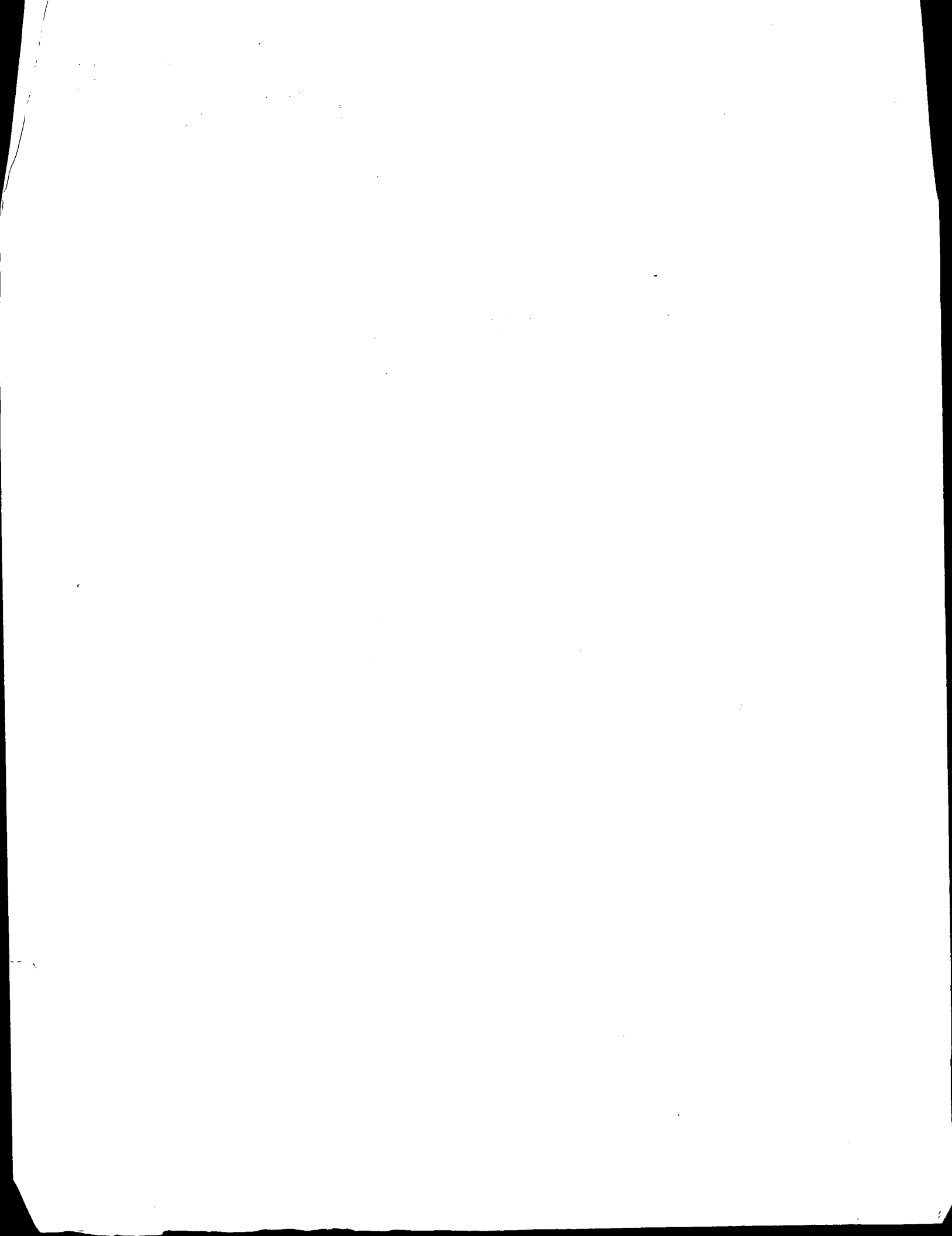
TITLE : ULTRATHERMORESISTANT ACIDIC  
ALPHA-AMYLASE AND DNA  
FRAGMENT CONTAINING GENE FOR  
PRODUCING THE ALPHA-AMYLASE

Ala Lys Tyr Ser Glu Leu Glu Gly Gly Val Ile Met Gln Ala Phe  
1 5 10 15  
Tyr Trp Asp Val Pro Ala Gly Gly Ile Trp Trp Asp Thr Ile Arg Ser  
20 25 30  
Lys Ile Pro Glu Trp Tyr Glu Ala Gly Ile Ser Ala Ile Trp Ile Pro  
35 40 45  
|  
|  
|  
|  
Asp Lys Tyr Val Glu Ser Ser Gly Trp Val Tyr Leu Glu Ala Pro Ala  
405 410 415  
Tyr Asp Pro Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Tyr Thr Val Trp Ser Tyr Cys  
420 425 430  
Gly Val Gly  
435

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme holding the activity even in boiling water, having an excellent starch-liquidizing ability even under an acidic condition, and useful for improving a starch-liquidizing process, etc., by culturing an ultrathermoresistant bacterial strain KOD-1 and subsequently separating the enzyme from the culture solution.

SOLUTION: This ultrathermoresistant acidic  $\alpha$ -amylase has an amino acid sequence of the formula or the amino acid sequence of the formula wherein one or more amino acids are deleted, added or replaced, has the optimal pH of approximately 5.0 and the optimal temperature of approximately 100°C at a pH of 5.0, and retains the activity of at least 50%, after thermally treated at a pH of 5.0 and at a temperature of 100°C in the absence of starch and calcium ions for 3hr. The new  $\alpha$ -amylase has a starch- liquidizing ability under acidic and high temperature conditions, and thereby is useful for improving a starch-liquidizing process, etc. The enzyme is obtained by inoculating the ultrathermophilic bacterium strain KOD-1 (FERM P-15007) on a culture medium, culturing the bacterium at 85°C for 14hr, centrifuging the cultured solution, and subsequently concentrating the obtained supernatant with an ultrafiltration membrane.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-173077

(43) 公開日 平成9年(1997)7月8日

| (51) Int.Cl. <sup>6</sup>            | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I           | 技術表示箇所  |
|--------------------------------------|-------|---------|---------------|---------|
| C 1 2 N 15/09                        | Z N A | 9282-4B | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 0 7 H 21/04                        |       |         | C 0 7 H 21/04 | B       |
| C 1 2 N 1/21                         |       |         | C 1 2 N 1/21  |         |
| 9/30                                 |       |         | 9/30          |         |
| C 1 2 P 19/14                        |       |         | C 1 2 P 19/14 | Z       |
| 審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁) 最終頁に続く |       |         |               |         |

(21) 出願番号 特願平8-191138

(22) 出願日 平成8年(1996)7月19日

(31) 優先権主張番号 特願平7-216454

(32) 優先日 平7(1995)7月20日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 595122372

今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号

(71) 出願人 591112038

ナガセ生化学工業株式会社

大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号

(72) 発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号

(72) 発明者 橘 佳永

京都府福知山市長田野町1の52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 超耐熱性酸性 $\alpha$ -アミラーゼおよび該 $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片

(57) 【要約】

【課題】 超耐熱性酸性 $\alpha$ -アミラーゼを提供すること。

【解決手段】 KOD-1株を培養してその培養液から超耐熱性酸性 $\alpha$ -アミラーゼを単離する。この $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を取得して遺伝子組換え技術を用いて $\alpha$ -アミラーゼを産生する。この $\alpha$ -アミラーゼは酸性条件下で優れたデンブン液化能をもち、工業的なデンブン液化工程の改善に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の理化学的性質を有することを特徴とする $\alpha$ -アミラーゼ：

- (1) 至適pHが5.0付近である；
- (2) pH5.0における至適温度が100℃付近である；および
- (3) デンプンおよびカルシウムイオンの非存在下で、pH5.0、100℃、3時間の熱処理後、少なくとも50%以上活性が残存する。

【請求項2】 超好熱菌菌株KOD-1株から得られる、請求項1に記載の $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列または該配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の欠失、付加、または置換を含むアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の $\alpha$ -アミラーゼ。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の $\alpha$ -アミラーゼをコードするDNA断片。

【請求項5】 配列番号1の530位のGから1834位のAまでのDNA配列または該DNA配列中のヌクレオチドの1またはそれ以上の欠失、付加、または置換を含むDNA配列を有する、請求項4に記載のDNA断片。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNA断片を含む $\alpha$ -アミラーゼ発現ベクター。

【請求項7】 請求項6に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項8】 請求項7に記載の形質転換された宿主細胞を培養することを特徴とする、請求項1に記載の $\alpha$ -アミラーゼの産生方法。

【請求項9】 以下の工程：

- (a) 約30 (W/V) %濃度のデンプンスラリーに、請求項1～3のいずれかに記載の $\alpha$ -アミラーゼを添加し、pHを4.0～6.0に調整する工程；
- (b) 塩化カルシウムを添加する工程；
- (c) ジェットクッカーで液化を行う工程；
- (d) pHを4.5に調整する工程；および
- (e) グルコアミラーゼを添加して、糖化を行う工程、を含む、グルコースの製造方法。

【請求項10】 以下の工程：

- (a) 約30 (W/V) %濃度のデンプンスラリーに、請求項1～3のいずれかに記載の $\alpha$ -アミラーゼを添加し、pHを4.0～6.0に調整する工程；
- (b) 塩化カルシウムを添加する工程；
- (c) ジェットクッカーで液化を行う工程；
- (d) pHを5.5に調整する工程；
- (e)  $\beta$ -アミラーゼを添加して、糖化を行う工程、を含む、マルトースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は $\alpha$ -アミラーゼ、特に超好熱菌由来の超耐熱性酸性 $\alpha$ -アミラーゼおよびそ

の酵素をコードする $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片に関する。 $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を組み込んだ発現ベクターを作製し、この発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養して $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を発現させることにより、工業的に有利な条件下で目的の酵素を大量生産することが可能となる。さらに、部位特異的変異導入法等により、酸性条件下や高温条件下で安定性の増大した酵素を生産することも可能となる。

【0002】

【従来の技術】 1972年、Brockらによってイエローストーン温泉中より好熱好酸性細菌*Sulfolobus*が単離されて以来、多数の超好熱菌が分離されている。超好熱菌は、80℃以上に生育最適温度を有する微生物であるので、これらの菌が生産する酵素群が非常に耐熱性に優れていることが期待されている。事実、超好熱菌の生産する酵素の熱失活温度が菌の生育可能上限温度より高い温度である場合が多く、中には100℃以上の至適温度をもつ酵素もある。このような超耐熱性酵素は、産業上の利用面からも有用性が高く、その探索および研究開発が世界中で広く進められている。

【0003】 他方、 $\alpha$ -アミラーゼは広く自然界に分布しており、これまでに種々の性質の $\alpha$ -アミラーゼが取得され、産業上利用されている。 $\alpha$ -アミラーゼの活性は、例えば、工業的には、デンプンの液化として知られる工程で、 $\alpha$ -1,4グルコシド結合をエンド型で加水分解することにより特徴づけられる。工業的なデンプン液化においては、デンプン液の粘度が高く、物質移動の問題があるため、できる限り高い温度で行われる。このデンプン液化の工程は、安価な原料から、大量のオリゴ糖あるいはD-グルコースを製造する際の重要な工程となっている。従来、工業的に利用できる耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼは、中性付近(pH6～8)に至適pHをもつため、工業的なデンプンの液化は通常pH6付近で行われている。しかしながら、特に、D-グルコースの製造においては、デンプンの液化工程に続いて行われる糖化工程で用いられるグルコアミラーゼの至適pHが4.5付近であるため、液化工程終了後に、液化液のpHを4.5に調整する必要があること、および酸性条件化で液化した液化液を用いて糖化を行った方がD-グルコースの収率が向上することより酸性条件下での液化工程の優位性が広く知られており、酸性条件下でデンプン液化能をもつ工業用 $\alpha$ -アミラーゼの供給が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、優れた耐熱性を有する酸性 $\alpha$ -アミラーゼを提供すること、およびこの酵素を、 $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を取得し、遺伝子操作による育種を利用して産生して提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、以下の

理化学的性質を有することを特徴とする $\alpha$ -アミラーゼが提供される：

- (1) 至適pHが5.0付近である；
- (2) pH5.0における至適温度が100℃付近である；および
- (3) デンブンおよびカルシウムイオンの非存在下で、pH5.0、100℃、3時間の熱処理後、少なくとも50%以上活性が残存する。

【0006】好ましい実施態様においては、前記 $\alpha$ -アミラーゼは超好熱菌菌株KOD-1株から得られる。

【0007】好ましい実施態様においては、前記 $\alpha$ -アミラーゼは配列番号2に示すアミノ酸配列またはその配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の欠失、付加、または置換を含むアミノ酸配列を有する。

【0008】本発明によれば、前記 $\alpha$ -アミラーゼをコードするDNA断片が提供される。

【0009】好ましい実施態様においては、前記DNA断片は配列番号1の530位のGから1834位のAまでのDNA配列またはその配列中のヌクレオチドの1またはそれ以上の欠失、付加、または置換を含むDNA配列を有する。

【0010】本発明によれば、前記DNA断片を含む $\alpha$ -アミラーゼ発現ベクターが提供される。

【0011】本発明によれば、前記発現ベクターで形質転換された宿主細胞が提供される。

【0012】本発明によれば、前記形質転換された宿主細胞を培養することを特徴とする、 $\alpha$ -アミラーゼの産生方法が提供される。

【0013】本発明によれば、以下の工程：

- (a) 約30 (W/V) %濃度のデンブンスラリーに、 $\alpha$ -アミラーゼを添加し、pHを4.0~6.0に調整する工程；
- (b) 塩化カルシウムを添加する工程；
- (c) ジェットクーラーで液化を行う工程；
- (d) pHを4.5に調整する工程；
- (e) グルコアミラーゼを添加して、糖化を行う工程、を含む、グルコースの製造方法が提供される。

【0014】本発明によれば、以下の工程：

- (a) 約30 (W/V) %濃度のデンブンスラリーに、 $\alpha$ -アミラーゼを添加し、pHを4.0~6.0に調整する工程；
- (b) 塩化カルシウムを添加する工程；
- (c) ジェットクーラーで液化を行う工程；
- (d) pHを5.5に調整する工程；
- (e)  $\beta$ -アミラーゼを添加して糖化を行う工程、を含む、マルトースの製造方法が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳しく説明する。

【0016】本発明は、超好熱菌が産生する耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを、本来の産生菌株を培養することにより、または $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を取得し、このDNA断片を含む発現ベクターを構築し、この発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養することによ

り耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを産生する方法に関する。

【0017】本発明に用いる超好熱菌は、80℃以上で生育する微生物であると定義される。好ましくは超好熱菌は、優れた耐熱性を有する酸性 $\alpha$ -アミラーゼを産生する、本発明者らが単離した耐熱性チオールプロテアーゼ産生菌KOD-1株 (Appl. Environ. Microbiol. 60(12), 4559-4566(1994)) である。KOD-1株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-15007号である。なお、このKOD-1株は、上記文献に記載されているように、分離された当初Pyrococcus属に分類されていたが、その後の知見の集積により、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング社製) に入力されているGenBank (登録商標) R91.0 October, 1995+ Daily Updateの登録データを用いた16S rRNAの配列の比較から、KOD-1株はPyrococcus属よりはむしろThermococcus属に近縁であることが示唆されている。

【0018】本発明で用いる微生物を培養して、本発明の $\alpha$ -アミラーゼを生産させるには、例えば前述の報文 (Appl. Environ. Microbiol. 60(12), 4559-4566(1994)) に記載の培養条件により、静置培養あるいは窒素ガスによる通気攪拌培養により、連続的あるいは回分的に行うことができる。なお、かかる微生物を培養して、本発明の $\alpha$ -アミラーゼを生産させるための培養条件は、微生物が生育する範囲内であれば特に限定はない。

【0019】このようにして培養した後、得られる培養物から常法により本発明の $\alpha$ -アミラーゼを回収する。

例えば培養物を遠心分離またはろ過することによって菌体を分離して上澄を得、この上澄から通常的手段、例えば、塩析法、溶媒沈澱法 (例えば、エタノール、アセトン等) によって目的酵素蛋白を沈澱させたり、また、限外ろ過 (例えば、ダイヤフロームメンブレンYC、アミコン社製) により濃縮させて、本発明の $\alpha$ -アミラーゼを得る。塩析法、溶媒沈澱法では、 $\alpha$ -アミラーゼを沈澱させ、ろ過あるいは遠心分離、脱塩処理した後、これを凍結乾燥粉末とすることもできる。さらに上記で得られた $\alpha$ -アミラーゼを塩析、溶媒沈澱、等電点沈澱、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー、晶出等の通常の酵素の精製手段を適宜組合せることによって、比活性の向上した粗酵素ないし精製酵素とすることもできる。

【0020】得られたサンプルを用いて、酵素のより詳細な性質を調べることができる。酵素活性は、基質 (例えば、可溶性デンブン) 溶液に供試酵素液を加え、反応させた後、生成した還元糖をDNS法 (3,5-ジニトロサリチル酸法) により測定することで測定し得る。

【0021】デンブンへの作用は、酵素を可溶性デンブンと反応させた後、オリゴ糖の生成パターンを薄層クロマトグラフィー (TLC) で検出することにより調べ得る。

【0022】至適pHおよび至適温度は、可溶性デンブン

を基質として、各種pHまたは各種温度で酵素反応させて調べることができる。

【0023】温度安定性は、緩衝液中で酵素を、一定の温度（例えば、100℃）で一定時間（例えば、40、60、120、180分間）熱処理し、水冷した後、残存活性を測定することにより調べることができる。

【0024】 $\alpha$ -アミラーゼの分子量は、酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、活性染色することにより測定し得る。即ち、電気泳動後のゲルを可溶性デンプンを含む緩衝液に浸漬し、インキュベートした後、ゲルを水洗し、水洗後のゲルを $I_2$ -KI水溶液につけ、ゲル中に残存しているデンプンを発色させる。このとき $\alpha$ -アミラーゼのバンドは、無色のバンドとして検出される。

【0025】超好熱菌菌株由来の耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片は、例えば、超好熱菌菌株から染色体DNAを単離し、この染色体DNAを含むライブラリーを作製し、このライブラリーをスクリーニングすることにより取得できる。

【0026】超好熱菌菌株の染色体DNAは、菌株を培養し、集菌後、N-ラウリルサルコシン溶液を加えて完全に溶菌させ、塩化セシウム平衡密度勾配超遠心法により分離して得ることができる。ライブラリーは、染色体DNAを各種制限酵素で切断した後、同一の制限酵素または共通の切断末端を与えるの制限酵素で切断したベクターDNAにT4 DNAリガーゼを用いて連結することにより得ることができる。スクリーニングは、このライブラリーにより宿主、例えば*Escherichia coli*を形質転換し、得られた形質転換株から、目的の $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片が組込まれたプラスミドを保持する株を選択することにより行うことができる。その選択法の一例は、形質転換株が生育している寒天平板培地上に架橋デンプン（例えば、日濃化学社製セレックス）寒天培地を重ねし、一定時間経過後、架橋デンプンが $\alpha$ -アミラーゼにより分解されることによってコロニーの周囲にクリアゾーンが形成されることを指標として行う。

【0027】得られたクローンの解析は、例えば選択された形質転換株からの組換えDNA分子の回収、制限地図の作製、および塩基配列の決定などにより行われる。選択された*Escherichia coli*形質転換株からのプラスミドの抽出は次のような常法によって行うことができる。目的のプラスミドを保持する*Escherichia coli*を培養し、集菌後、リゾチーム溶液を加えて一定時間おく。次にSDS-NaOH溶液を加えて完全に溶菌させた後、酢酸ナトリウム溶液を添加し、一定時間水中においた後、遠心分離により上清を得、フェノール処理、エタノール沈澱によりプラスミドDNAを回収する。DNAを緩衝液に溶解し、RNAseを添加し、一定時間保温した後、フェノール処理、エタノール沈澱によりプラスミドDNAを回収する。塩基配列は、制限地図を作製し、配列を決定しようとするDNA

断片を適切なベクターにサブクローン化した後、ジデオキシ法により決定し得る。

【0028】得られたクローン由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を含むDNA断片を、宿主細胞に適合性の発現ベクター中に作動可能に挿入し、この発現ベクターで適切な宿主細胞を形質転換し、形質転換された宿主細胞を培養することにより、 $\alpha$ -アミラーゼが発現される。本発明で用いられる宿主細胞は、遺伝子組換えの宿主として使用されるものであれば特に限定しないが、好ましくは*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*などの細菌細胞が好ましい。

【0029】グルコースの製造は基本的には以下のように実施し得る：約30 (W/V) %濃度のデンプンスラリーに、 $\alpha$ -アミラーゼ2~20 U/gDSを添加し、pHを4.0~6.0に調整する；塩化カルシウムを添加すれば酵素の安定性が増加され得る。添加する濃度は後処理を考慮すると0~5 mM程度が良い、好ましくは1 mM~3 mM程度である；ジェットクッカーで105~120℃、5分間液化を行う；基本的には熟成は不要であるが、熟成を行う場合には、90~95℃で適切な時間熟成を行う、0~45分間程度が好適である；pHを4.5に調整する；グルコアミラーゼ4 U/gDSを添加する（グルコアミラーゼとしては糸状菌などの微生物由来のものが使用可能であるが、*Aspergillus*属由来のものが好ましい；60℃、48時間糖化を行う。反応は、HPLCを用いた糖の定量により評価し得る。ここでDSは乾燥デンプンを表す。なお、グルコアミラーゼ活性は以下のように測定し得る：0.5%の可溶性デンプン（pH4.5, M/10酢酸緩衝液）9 mlに1 mlの酵素を加え、40℃、30分間反応させた時、10 mgのグルコースに相当する還元力を生成する活性を1単位（U）とする。

【0030】また、マルトースの製造は熟成まではグルコースと同様に実施し得る。その後の工程は以下のとおりである： $\beta$ -アミラーゼ5 U/gDSを添加する（ $\beta$ -アミラーゼとしては、高等植物および細菌などの微生物由来のものが使用可能であるが、ダイズ由来のものが好ましい）；55℃、48時間糖化を行う。反応は、HPLCを用いた糖の定量により評価し得る。なお、 $\beta$ -アミラーゼ活性は以下のように測定し得る：1.2%のバレイショデンプン糊液（pH5.5, N/20酢酸緩衝液）5 mlに酵素液1 mlを加え、40℃で20分間反応させ、この条件下で1分間に100  $\mu$ gのグルコース相当の還元力を生成する活性を1単位（U）とする。

【0031】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれら実施例に限定されるものではない。

【0032】実施例1 超好熱菌の産生する $\alpha$ -アミラーゼの精製および特徴づけ

(1) 酵素の粗精製

本発明で用いるKOD-1株を前述の報文（Appl. Environ.

Microbiol. 60(12), 4559-4566(1994))に記載の0.5×2216マリンブロー培养基(2216マリンブロー培养基18.7g/L、PIPES 3.48g/L、CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.725g/L、0.4 mL 0.2%レザズリン、475mL人工海水(NaCl 28.16 g/L、KCl 0.7 g/L、MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5.5 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6.9 g/L)、蒸留水500 mL、pH7.0) 1,000mlに接種して、2リットルの発酵槽により培養した。培養に際しては、発酵槽内を窒素ガスに置換し、同ガスで内圧を0.1Kg/cm<sup>2</sup>に維持し、培養温度85±1℃にて14時間培養した。なお、培養は静置培養で実施し、培養中窒素ガスの通気および攪拌は行わなかった。培養終了後、培養液(約1,000ml)を10,000rpmで10分間の遠心分離により除菌し、限外ろ過法(旭化成社製 限外ろ過モジュール AIP-1010)により約50mlまで濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥し、粗酵素サンプル3.36gを得た。酵素活性の測定法は以下の通りである: 0.5mlの基質溶液(最終濃度1%となるように可溶性デンプンを0.2M酢酸-NaOH緩衝液(pH4.5)の溶解した液)に供試酵素液0.5mlを加え、100℃で30分間反応する; 次いで氷水中で反応停止後、生成した還元糖をDNS法(3,5-ジニトロサリチル酸法)により測定する。この反応条件下で、1分間に1μmolのグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を1単位(U)とする。粗酵素サンプルのα-アミラーゼ活性は6.43U/gであり、総活性は、21.6Uであった。また、本培養で得られた菌株は、下記の実施例2の染色体DNA調製用として凍結保存した。得られた粗酵素を使用して本発明のα-アミラーゼの酵素学的性質および物理化学的性質を以下のように検討した。

#### 【0033】(2) 作用

(1)のα-アミラーゼを下記の酸性条件下でデンプンに作用させ、オリゴ糖の生成パターンを薄層クロマトグラフィー(TLC)で調べた。

【0034】基質: 可溶性デンプン(最終1%)

pH: 5.0(0.2M 酢酸-NaOH緩衝液)

温度: 100℃

作用時間: 0, 10, 30, 60, 120, 180, 240分間

酵素添加量: 2U

前記条件でα-アミラーゼを作用させた反応液(3μl)をシリカゲル60TLCプレート(メルク社製)にスポットし、イソプロピルアルコール: アセトン: 水=4: 4: 2で室温にて約240分間展開後、発色液(アニリン4ml、ジフェニルアミン4g、アセトン200ml、85%リン酸30mlの混合液)を噴霧し、105℃で30分間加熱して発色させた。この結果、作用時間とともにマルトテトラオース、マルトトリオース、マルトース、グルコースの顕著な生成が認められた。

#### 【0035】(3) 至適pH

可溶性デンプン1%を含む各pHの0.2M酢酸-NaOH緩衝液に1Uのα-アミラーゼを加え、90℃、30分間反応を行なった。至適pHでの活性を100%としたときの各pHでの相

対活性を図1に示した。

【0036】この図から明らかな如く、本発明のα-アミラーゼの至適pHは5.0付近である。

#### 【0037】(4) 至適温度

可溶性デンプンを基質として、pH5.0にて30分間各温度で1Uのα-アミラーゼを反応させ、至適温度での活性を100%としたときの各温度での相対活性を図2に示した。

【0038】この図から明らかな如く、本発明のα-アミラーゼの至適温度は100℃付近である。

#### 【0039】(5) 温度安定性

0.2M酢酸-NaOH緩衝液(pH5.0)に1Uのα-アミラーゼを加えて、100℃で40, 60, 120, 180分間熱処理し、氷冷した後、可溶性デンプンを基質として残存活性測定した。その結果を図3に示した。

【0040】この図より明らかな如く、本発明のα-アミラーゼは、100℃、pH5.0の条件下で3時間熱処理した後においても、少なくとも50%以上の活性が残存していた。

#### 【0041】(6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

12%のポリアクリルアミド濃度のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、本発明のα-アミラーゼの分子量を推定した。目的のα-アミラーゼのバンドの検出は、以下の条件での活性染色により行った。即ち、電気泳動後のゲルを1%可溶性デンプンを含む0.1M酢酸-NaOH緩衝液(pH5.0)に浸漬し、85℃で30分間インキュベート後、ゲルを水洗し、水洗後のゲルを0.005% I<sub>2</sub>-0.05% K I 水溶液につけ、ゲル中に残存しているデンプンを発色させた。α-アミラーゼのバンドは、無色のバンドとして検出された。なお、標準蛋白としてフォスホリラーゼb(Mw: 94,000)、牛血清アルブミン(Mw: 67,000)、卵白アルブミン(Mw: 43,000)、炭酸脱水酵素(Mw: 30,000)、トリプシンインヒビター(Mw: 20,100)を用い、本発明のα-アミラーゼと同条件で泳動後、クマシーブリリアントブルーR-250(CBB)により染色し、分子量マーカーとした。その結果、本発明のα-アミラーゼのバンドは43,000付近に認められた。

【0042】以上から、本発明のα-アミラーゼは、酸性かつ高温の条件下で優れたデンプン分解活性を発揮し、さらに同条件下で高い安定性を示した。従って、本発明のα-アミラーゼは、酸性条件下でデンプン液化能を有する優れた耐熱性を持つ酸性α-アミラーゼであることが明らかとなった。

#### 【0043】実施例2 α-アミラーゼ産生遺伝子のクローニング

##### (1) KOD-1株からの染色体DNAの調製

実施例1の培養で得られた菌体1gを10mlのA溶液(50mM Tris-HCl、50mM EDTA、pH8.0)に懸濁し、遠心分離(8,000rpm、5分間、4℃)により集菌後、3mlの15%

ショ糖を含むA溶液に懸濁し、37℃にて30分間保温後、1% N-ラウリルサルコシンを含むA溶液3mlを添加した。この液にさらに5.4gの塩化セシウムと10mg/mlの臭化エチジウム溶液300μlを添加し、55,000rpm、16時間、18℃にて超遠心分離を行い、染色体DNAを分画した。得られた染色体DNA画分からn-ブタノール抽出により臭化エチジウムを除去後、TE溶液(10mM Tris-HCl、0.1mM EDTA、pH8.0)に対して一夜透析し、染色体DNAを得た。

【0044】(2)ショットガンクローニングによる本発明のα-アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片の検索  
ベクターDNA pUC18および(1)で調製した染色体DNAを制限酵素Pst Iで切断した。なお、このDNAの切断においては、DNA 1μgの切断に対し制限酵素を10単位の割合で添加し、制限酵素のカatalog記載の条件で反応を行った。上記のPst Iで切断されたpUC18および染色体DNAをおよそ1:1の割合になるように混合し、DNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて両者を連結させることにより、組換えプラスミドを得た。連結方法はライゲーションキットの使用説明書に従った。

【0045】次に上記組換えプラスミドをEscherichia coli JM109のコンピテントセルに添加し、水中に30分間放置した後、42℃で2分間保温した。これを1.5mlのトリプトン1%、酵母エキス0.5%、NaCl 0.5%からなる培地(以下「LB培地」という)に接種して、37℃で1時間培養した。この培養液を100μg/mlアンピシリン、200μg/ml 5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(X-gal)、24μg/mlイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を含むLB寒天培地に塗抹し、37℃で一夜培養することによって、アンピシリン耐性かつ白色のコロニーを作るEscherichia coli形質転換株約300株を得た。これらの白色コロニーを上記のLB寒天培地に釣菌し、37℃で一夜培養後、架橋デンアン寒天培地(セレックス(日澱化学社製)0.5%、0.2M酢酸-NaOH緩衝液(pH5.0)、寒天2%)を重ねし、60℃で2日間保温後コロニーの周囲のクリアゾーンの形成度を観察した。その結果、クリアゾーンを形成するコロニーを1株得、T-16株と命名した。

【0046】(3)取得形質転換株(T-16株)の生産するα-アミラーゼの検出

(2)で得られたT-16株を200mlのLB培地(100μg/mlのアンピシリンを含む)に接種し、37℃にて振とう培養した。培養開始後4時間目にIPTGを最終1mMとなるように添加し、さらに4時間培養した。培養後、遠心分離により集菌し、菌体を50mM酢酸-NaOH緩衝液(pH5.5)10mlに懸濁し、氷冷下で超音波処理により菌体を破碎し、遠心分離により上澄10mlを得、酵素液とした。この酵素液を用いて、T-16株の生産するα-アミラーゼを実施例1に記載のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および活性染色により検出したところ、元株であるKOD-1株の生

産する本発明のα-アミラーゼ同様、43,000付近に活性バンドを与えた。また、宿主Escherichia coli JM109の菌体破碎液には、上記の活性バンドが認められなかったことより、T-16株が本発明のα-アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片を有するクローンであることが判明した。

【0047】(4)クローニングされたDNA断片の確認  
(2)で得られたT-16株から、以下の常法によってプラスミドDNAを抽出した。即ち、T-16株を100μg/mlアンピシリンを含むLB培地500mlに接種し、37℃で一夜振とう培養後、遠心分離により集菌した。菌体を緩衝液(50mM グルコース、25mM Tris-HCl、10mM EDTA、pH8.0)8mlに懸濁し、これに50mg/mlリゾチーム溶液2mlを加え、氷中に5分間おき、次いでSDS溶液(0.2N NaOH、1%SDS)20mlを加え、氷中に10分間おき、3M酢酸カリウム(pH4.8)15mlを加え、氷中に30分間おき、遠心分離により上澄を得、フェノール抽出、エタノール沈澱でプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAを8mlのTE溶液に溶解し、20μg/mlとなるようにRNaseAを加え、37℃で1時間保温後、再度フェノール抽出、エタノール沈澱でプラスミドDNAを回収し、これを9mlのTE溶液に溶解した。得られたプラスミドDNAを(2)に記載の条件でPst Iにて切断し、1%アガロースゲル電気泳動を行い、λ/HindIII digest-φX174/HaeIII digest(東洋紡社製)をサイズマーカーとして、プラスミドDNA上の挿入DNA断片の大きさを測定したところ、約2.2Kbであった。なお、本プラスミドDNAをpAA-7と命名した。

【0048】(5)クローニングされたDNA断片の塩基配列の決定  
プラスミドpAA-7上の挿入DNA断片の塩基配列の決定のため、段階的欠損法によって塩基配列決定用プラスミドを構築し、塩基配列の決定をジデオキシ法により行った。段階的欠損法にはキロシークエンス用デレーションキット(宝酒造社製)を、また、ジデオキシ法にはAutoRead Sequencing Kit(ファルマシア社製)を用い、A.L.F.D NAシークエンサーII(ファルマシア社製)により塩基配列を決定した。なお、方法はそれぞれの使用説明書に従った。

【0049】その結果、挿入DNA断片の塩基配列は、配列表の配列番号1に示す通りであり、また、挿入DNA断片の全長は2179bpであった。また得られたDNA断片中に見出された最大のオープンリーディングフレームは配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を含んでいた。このアミノ酸配列を公知のPyrococcus furiosus DSM 3638株由来の超耐熱性α-アミラーゼ(国際公開第WO 94/19454号)のアミノ酸配列と比較したところ、全体にわたって約11%の差異が認められた(図4参照)。

【0050】実施例3 グルコースの製造

(1)塩化カルシウムによる安定化効果



塩化カルシウムの添加による $\alpha$ -アミラーゼの安定化効果を検討した。 $\alpha$ -アミラーゼを0.1 M酢酸緩衝液(pH6.0)に150 DUN/mlになるように加え、塩化カルシウム0または1 mMおよび基質(サンデック#100)0、10、20、または30%の存在下で種々の温度で15分間インキュベートした後、残存する酵素活性を測定した。結果を図5に示す。 $\alpha$ -アミラーゼは、塩化カルシウムおよび基質の存在により安定化されることが示された。1 DUNは1%バレイショデンプン糊液(pH6.0, M/10酢酸緩衝液)10 mlに1 mlの酵素を加え、40℃、1分間作用させた時、 $I_2$ 呈色値を1%減少させる活性と定義する。

#### 【0051】(2) 熟成時間の影響

グルコースの製造は基本的には以下のように実施し得る：約30 (W/V) %濃度のデンプンスラリーに、 $\alpha$ -アミラーゼ5~15 DUN/gDSを添加し、pHを4.0~6.0に調整する；塩化カルシウムを添加すれば酵素の安定性が増加さ

れ得る。添加する濃度は後処理を考慮すると0~5 mM程度が良い、好ましくは1 mM~3 mM程度である；ジェットクッカーで105~120℃、5分間液化を行う；基本的には熟成は不要であるが、熟成を行う場合には、90~95℃で適切な時間熟成を行う。0~45分間程度が好適である；pHを4.5に調整する；Aspergillus属由来グルコアミラーゼ4 U/gDSを添加する；60℃、48時間糖化を行う。反応は、HPLCを用いた糖の定量により評価し得る。

【0052】デンプン濃度30 (W/V) %、酵素量15 DUN/gDS、塩化カルシウム濃度1 mM、液化pH6.0、液化温度115℃(液化にはジェットクッカーを使用)の条件で熟成時間を0分間または45分間としてグルコース(G1)の生成量を測定した。結果を表1に示す。この結果から、熟成時間は不要であることが示された。

#### 【0053】

##### 【表1】

| 熟成時間 | G1(%)  | G2(%) | G3(%) | G4<(%) |
|------|--------|-------|-------|--------|
| 0    | 95.732 | 1.348 | 1.649 | 1.271  |
| 45   | 95.648 | 1.286 | 1.857 | 1.209  |

#### 【0054】(3) 液化pHの影響

デンプン濃度30 (W/V) %、酵素量15 DUN/gDS、塩化カルシウム濃度1 mM、液化温度105℃(液化にはジェットクッカーを使用)、熟成時間45分間の条件で液化pHを4.0~6.0の間で変化させて、グルコース(G1)の生成量を測定した。結果を表2に示す。この結果から、pH4.0~p

H6.0の間では液化工程に差がないことが判明し、これに続く糖化工程におけるG1収率にも顕著な差がないことから、この範囲のpHでは液化前のpH調整が不要であることが示された。

#### 【0055】

##### 【表2】

| 液化pH | G1(%)  | G2(%) | G3(%) | G4<(%) |
|------|--------|-------|-------|--------|
| 6.0  | 94.088 | 1.755 | 1.821 | 2.336  |
| 5.0  | 92.426 | 2.606 | 1.627 | 3.341  |
| 4.0  | 95.934 | 1.909 | 0.852 | 1.305  |

#### 【0056】実施例4 マルトースの製造

##### (1) 熟成時間の影響

マルトースの製造は熟成まではグルコースと同様に実施し得る。その後の工程は以下のとおりである： $\beta$ -アミラーゼ5 U/gDSを添加する；55℃、48時間糖化を行う。反応は、HPLCを用いた糖の定量により評価し得る。

【0057】デンプン濃度30 (W/V) %、酵素量15 DUN/gDS、塩化カルシウム濃度1 mM、液化pH6.0、液化温度115

℃(液化にはジェットクッカーを使用)の条件で熟成時間を0分間または45分間としてマルトース(G2)の生成量を測定した。結果を表3に示す。この結果から、グルコースの場合と同様に、この範囲のpHでは熟成時間は不要であることが示された。

#### 【0058】

##### 【表3】

| 熟成時間 | G1(%) | G2(%)  | G3(%)  | G4<(%) |
|------|-------|--------|--------|--------|
| 0    | 1.493 | 60.001 | 14.886 | 23.620 |
| 45   | 1.974 | 56.911 | 17.780 | 23.335 |

#### 【0059】(2) 液化pHの影響

デンプン濃度30 (W/V) %、酵素量15 DUN/gDS、塩化カルシウム濃度1 mM、液化温度105℃(液化にはジェットクッカーを使用)、熟成時間45分間の条件で液化pHを4.0

~6.0の間で変化させて、マルトース(G2)の生成量を測定した。結果を表4に示す。この結果から、グルコースの場合と同様に、pH4.0~pH6.0の間では液化工程に差がないことが判明し、これに続く糖化工程におけるG2収

率にも顕著な差がないことから、この範囲のpHでは液化前のpH調整が不要であることが示された。

【0060】

【表4】

| 液化pH | G1(%) | G2(%)  | G3(%)  | G4(%)  |
|------|-------|--------|--------|--------|
| 6.0  | 2.643 | 55.835 | 18.538 | 22.984 |
| 5.0  | 2.686 | 55.629 | 18.672 | 23.013 |
| 4.0  | 1.307 | 61.642 | 10.092 | 26.959 |

【0061】

【発明の効果】以上、詳細に説明した通り、酸性かつ高温条件下で優れたデンプン分解活性を発揮する $\alpha$ -アミラーゼが取得された。本 $\alpha$ -アミラーゼは、酸性条件下でデンプン液化能を有する優れた耐熱性をもつ酸性 $\alpha$ -アミラーゼであり、工業的なデンプン液化工程の工程改善に有用な酵素である。

【0062】また、本発明の $\alpha$ -アミラーゼ産生遺伝子を含むDNA断片が取得された。このDNA断片を用いることによりこの $\alpha$ -アミラーゼの高生産微生物を育種することができ、 $\alpha$ -アミラーゼを効率よく製造する道が開かれた。さらに、このDNA断片は、部位特異的変異導入法等により、酸性条件下や高温条件下で安定性の増大した

$\alpha$ -アミラーゼを創製するための材料にもなり得る。

【0063】

【配列表】

【0064】

【配列番号1】

配列の長さ：2179

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

株名：KOD-1（受託番号FERM P-15007）

配列

```

CTGCAGGTCG AGGCTGAAAG AATAGTTATG ATACTCGAAA AGAGTGGCTT CCAGATAAAG      60
GACAGGGAAG CCCTCAAGGC CCTTATAAAG GAAGTCCTCA ATACAATCGA ACTCCGCTCT      120
CAGCCAGTCA TAAAGAGAAT TTCAGATGCC AACATTGAAC TGACGGAGAT AGAGCTGTTC      180
CACCTCCTCA ACATGCTCGT CTCTTCCAG AGCTGCGAGC TCTGCGATCA CGCGAAAAGA      240
GTAAAGACC TCATCTCGTT CTGATGCATC CATCTTGTT AATTTCTATT TTGGACTTTC      300
AAGTTGTTGG CAACTCCAAC GTAACATAAA GACACAAAAC CAATATTGAG CATTGTGCAT      360
AGTAATGTTT TCCAATGTTT TTAATGGCA AACTTAAAT ATTTACCAG CAGTGATACA      420
TAGAGACACC GCTGAACACA GAGGTGGTTC CATGAAGAAG TTTGTCGCCC TGCTCATAAC      480
CATGTTTTTC GTAGTGAGCA TGGCTGCCGT TGCACAGCCA GCTAGCGCCG CAAAGTATTC      540
CGAACTCGAA GAAGGCGGCG TTATAATGCA GGCCTTCTAC TGGGACGTTT CAGCGGGAGG      600
AATCTGGTGG GATACAATCA GAAGCAAGAT ACCGGAGTGG TACGAGGCTG GAATCTCCGC      660
CATCTGGATT CCGCCAGCCA GCAAGGGCAT GGGAGGAGCT TATTCATGG GCTACGACCC      720
ATACGACTTC TTCGACCTCG GCGAGTACAA CCAGAAGGGA ACAGTTGAAA CTCGCTTTGG      780
CTCAAAGCAG GAGCTTATCA ACATGATAAA CACCGCCCAT GCCTACGGCA TAAAGGTCAT      840
AGCTGATATC GTCATAAACC ACCGCGCGGG CGGAGACCTC GAGTGAACC CGTTCGTTGG      900
GGACTACACC TGGACGGACT TCTCGAAGGT GGCCTCGGGC AAATATACCG CCAACTACCT      960
CGACTTCCAC CCCAACGAGG TCAAGTGCTG TGACGAGGGC ACATTGGAG GTTCCCAGA      1020
CATAGCCAC GAGAAGGAGA GGGACGAGCA CTGGCTCTGG GCGAGCGACG AGAGCTACGC      1080
CGCCTACCTC AGGAGCATCG GCCTTGATGC CTGGCGTTTC GACTACGTAA AGGGCTACGG      1140
AGCGTGGGTC GTCAAGGACT GGCTCAACTG GTGGGGCGGC TGGGCCGTCG GTGAGTACTG      1200
GGACACGAAC GTTGATGCAC TCCTCAATTG GGCATACTCG AGCGCGCCA AGGTCTTCGA      1260
CTTCCCGCTC TACTACAAA TGGACGAGGC CTTTGACAAC ACCAACATCC CGGCCTTGGT      1320
TGATGCCCTC CAGAACGGGG GAACCGTCGT CTCTCGGAC CCGTTCAAGG CCGTAACCTT      1380
TGTAGCAAAC CACGACACCG ATATAATCTG GAACAAGTAC CCTGCTTATG CTTTCATCCT      1440
CACCTACGAG GGCCAGCCCG TCATATTCTA CCGCGACTAC GAGGAGTGGC TCAACAAGGA      1500
CAAGCTTAAC AACCTAATCT GGATACACGA CCACCTCGCG GGTGAAGCA CGAGCATAGT      1560

```

CTACTACGAC AGCGACGAGC TGATCTTCGT GAGGAACGGC GACTCCAAGA GGCCGGGACT 1620  
 GATAACGTAC ATCAACCTCG GCTCTAGCAA GGTCCGAAGG TGGGTGTACG TGCCGAAGTT 1680  
 CGCGGGCGCG TGCATCCACG AGTACACCGG CAACCTCGGA GGCTGGGTAG ACAAGTACGT 1740  
 CGAGTCGAGC GGCTGGGTCT ATCTCGAAGC TCCAGCTTAC GACCCCGCCA GCGGGCAGTA 1800  
 CGGCTACACC GTCTGGAGCT ACTGCGGGGT TGGATGATAG CCCCCCTTTT CATTCTTTT 1860  
 GGATTCATA GACCTCATCC GTTAGATAAT TTCCTGTAAC TCTCTGACC GGAATCTCAA 1920  
 CCGTCCCAT TCTGTTTCA ATTCTTACCA GCACATCGTA GAGCCTCCCC CTCACTCGA 1980  
 CGGTCTCGTT CACGCAGGTG GTCTCATTCTG CTGTCCTGAA CTTGAAGATT AGTATTGCAT 2040  
 TCCTCTCTAG GCTGTAACCT ATGTAAATGG CATTGAGACA GCCGGTCAAG GTTATGCGTC 2100  
 TCGTTAAGGC ATCATCAAGA GTTTTGTAGC AGTTCTCTCT CCTGAAAACA AAAGTGTTCAT 2160  
 TCTGGCTCTC CCCCTGCAG 2179

【0065】

【配列番号2】

配列の長さ: 435

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

配列

Ala Lys Tyr Ser Glu Leu Glu Gly Gly Val Ile Met Gln Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Trp Asp Val Pro Ala Gly Gly Ile Trp Trp Asp Thr Ile Arg Ser  
 20 25 30  
 Lys Ile Pro Glu Trp Tyr Glu Ala Gly Ile Ser Ala Ile Trp Ile Pro  
 35 40 45  
 Pro Ala Ser Lys Gly Met Gly Gly Ala Tyr Ser Met Gly Tyr Asp Pro  
 50 55 60  
 Tyr Asp Phe Phe Asp Leu Gly Glu Tyr Asn Gln Lys Gly Thr Val Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Phe Gly Ser Lys Gln Glu Leu Ile Asn Met Ile Asn Thr Ala  
 85 90 95  
 His Ala Tyr Gly Ile Lys Val Ile Ala Asp Ile Val Ile Asn His Arg  
 100 105 110  
 Ala Gly Gly Asp Leu Glu Trp Asn Pro Phe Val Gly Asp Tyr Thr Trp  
 115 120 125  
 Thr Asp Phe Ser Lys Val Ala Ser Gly Lys Tyr Thr Ala Asn Tyr Leu  
 130 135 140  
 Asp Phe His Pro Asn Glu Val Lys Cys Cys Asp Glu Gly Thr Phe Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Phe Pro Asp Ile Ala His Glu Lys Glu Trp Asp Gln His Trp Leu  
 165 170 175  
 Trp Ala Ser Asp Glu Ser Tyr Ala Ala Tyr Leu Arg Ser Ile Gly Val  
 180 185 190  
 Asp Ala Trp Arg Phe Asp Tyr Val Lys Gly Tyr Gly Ala Trp Val Val  
 195 200 205  
 Lys Asp Trp Leu Asn Trp Trp Gly Gly Trp Ala Val Gly Glu Tyr Trp  
 210 215 220  
 Asp Thr Asn Val Asp Ala Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Ser Ser Gly Ala  
 225 230 235 240  
 Lys Val Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr Lys Met Asp Glu Ala Phe Asp  
 245 250 255  
 Asn Thr Asn Ile Pro Ala Leu Val Asp Ala Leu Gln Asn Gly Gly Thr  
 260 265 270  
 Val Val Ser Arg Asp Pro Phe Lys Ala Val Thr Phe Val Ala Asn His

|                             |                         |                 |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| 275                         | 280                     | 285             |
| Asp Thr Asp Ile Ile Trp     | Asn Lys Tyr Pro Ala Tyr | Ala Phe Ile Leu |
| 290                         | 295                     | 300             |
| Thr Tyr Glu Gly Gln Pro Val | Ile Phe Tyr Arg Asp Tyr | Glu Glu Trp     |
| 305                         | 310                     | 315             |
| Leu Asn Lys Asp Lys Leu Asn | Asn Leu Ile Trp Ile His | Asp His Leu     |
| 325                         | 330                     | 335             |
| Ala Gly Gly Ser Thr Ser Ile | Val Tyr Tyr Asp Ser Asp | Glu Leu Ile     |
| 340                         | 345                     | 350             |
| Phe Val Arg Asn Gly Asp Ser | Lys Arg Pro Gly Leu Ile | Thr Tyr Ile     |
| 355                         | 360                     | 365             |
| Asn Leu Gly Ser Ser Lys Val | Gly Arg Trp Val Tyr Val | Pro Lys Phe     |
| 370                         | 375                     | 380             |
| Ala Gly Ala Cys Ile His Glu | Tyr Thr Gly Asn Leu Gly | Gly Trp Val     |
| 385                         | 390                     | 395             |
| Asp Lys Tyr Val Glu Ser Ser | Gly Trp Val Tyr Leu Glu | Ala Pro Ala     |
| 405                         | 410                     | 415             |
| Tyr Asp Pro Ala Ser Gly Gln | Tyr Gly Tyr Thr Val Trp | Ser Tyr Cys     |
| 420                         | 425                     | 430             |
| Gly Val Gly                 |                         |                 |
| 435                         |                         |                 |

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 $\alpha$ -アミラーゼの各pHにおける相対活性を表すグラフである。

【図2】pH5.0での各温度における相対活性を表すグラフである。

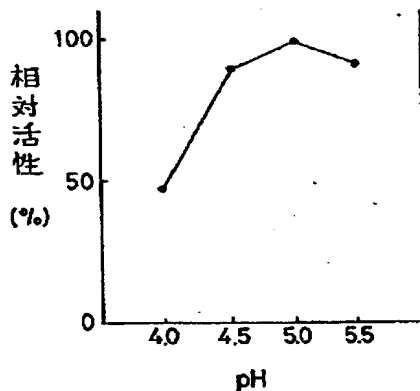
【図3】pH5.0、100℃にて種々の時間保温した後の残存

活性を示すグラフである。

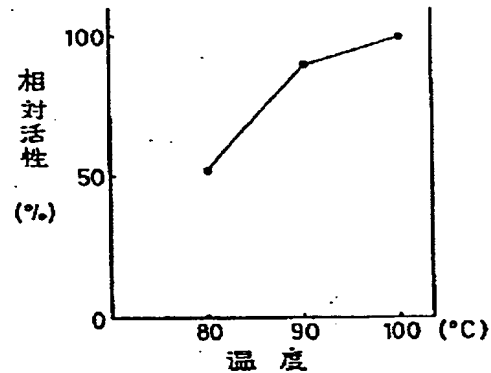
【図4】KOD-1株および*P. furiosus* DSM 3638株由来の $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列を比較する図である。

【図5】 $\alpha$ -アミラーゼの安定性に塩化カルシウムがおよぼす影響を示すグラフである。

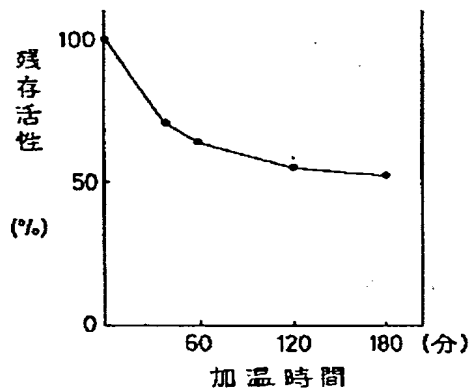
【図1】



【図2】



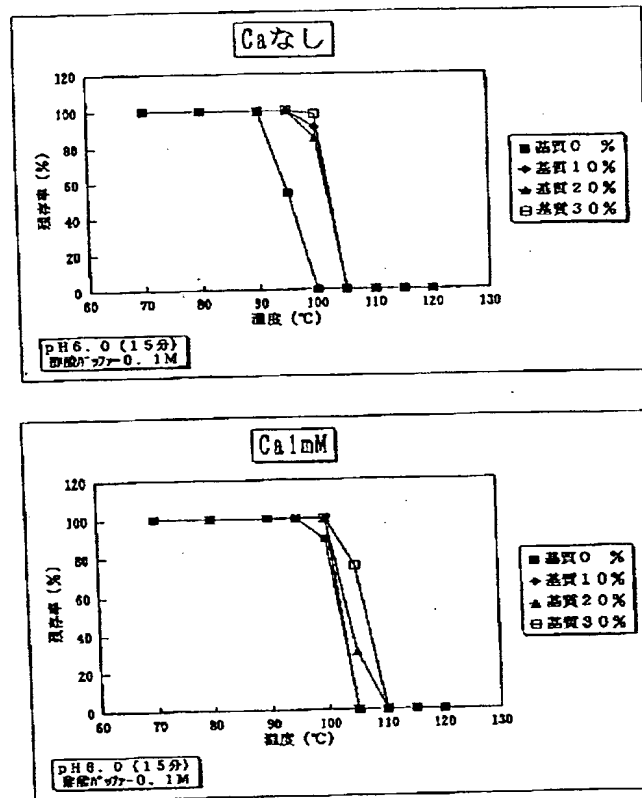
【図3】



【図4】

|                      |  |     |
|----------------------|--|-----|
| KOD-1                | AKYSELEEGGVIMQAFYWDVPAGGIWWDITRSKIPWYEAGISAIWIPPA  | 50  |
| P. furiosus DSM 3638 | AKYLELEEGGVIMQAFYWDVPGGGIWWDHIRSKIPWYEAGISAIWLPPP  | 50  |
| KOD-1                | SKGM-GGAYSMGYDPYDFDLGEYNQKGTVETRFSGSKQELINMINTAHAY | 99  |
| P. furiosus DSM 3638 | SKGMSGG-YSMGYDPYDFDLGEYYQKGTVETRFSGKEELVRLIQTAHAY  | 99  |
| KOD-1                | GIRKVIADIVINHRAGGDLEWNPFGDYTWDFSKVASGKYTANYLDFHPN  | 149 |
| P. furiosus DSM 3638 | GIRKVIADVIVINHRAGGDLEWNPFGDYTWDFSKVASGKYTANYLDFHPN | 149 |
| KOD-1                | EVRCCDEGTFGGFPDIAHEKEWDQHNLWASDESAAAYLRSIGVDAWRFDY | 199 |
| P. furiosus DSM 3638 | ELHCCDEGTFGGFPDICHKEWDQYWLKSNESYAAYLRSIGFDGWRFDY   | 199 |
| KOD-1                | VKGYGAWVVKDWLNMWGGWAVGEYWDTNVDALLMWAYSSGAKVDFDFLYY | 249 |
| P. furiosus DSM 3638 | VKGYGAWVVRDWLNMWGGWAVGEYWDTNVDALLSWAYESGAKVDFDFLYY | 249 |
| KOD-1                | KMDEAFDNTNIPALVDALQNGGTVYSRDPFKAVTFVANHDTDIIMNKYPA | 299 |
| P. furiosus DSM 3638 | KMDEAFDNNIPALVYALQNGQTVYSRDPFKAVTFVANHDTDIIMNKYPA  | 299 |
| KOD-1                | YAFILTYEGQPVIIFYRDYEELNKKDLNLIWIHDLAGGSTSIVYYDSD   | 349 |
| P. furiosus DSM 3638 | YAFILTYEGQPVIIFYRDFEELNKKDLNLIWIHDLAGGSTTIVYYDND   | 349 |
| KOD-1                | ELIFVRNGDSKRPGLITYINLGSSK-VGRWVYVPKFAGACIHEYTGNLGG | 398 |
| P. furiosus DSM 3638 | ELIFVRNGDSRRPGLITYINL-SPNWWGRWVYVPKFAGACIHEYTGNLGG | 398 |
| KOD-1                | WVDKYVESSGWVYLEAPAYDPASGQYGYTVWSYCGVG.....         | 435 |
| P. furiosus DSM 3638 | WVDKRVDSGWVYLEAPPHDPANGYYGYSVWSYCGVG.....          | 435 |

【図5】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

// (C12N 15/09

C12R 1:01)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12N 9/30

C12R 1:19)

識別記号

ZNA

片内整理番号

FI

技術表示箇所

(72)発明者 鈴木 裕治

京都府福知山市長田野町1の52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(72)発明者 小島 岩夫

京都府福知山市長田野町1の52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内

(72)発明者 卯津羅 健作

京都府福知山市長田野町1の52 ナガセ生  
化学工業株式会社福知山工場内